

世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<p>(51) 国際特許分類 C12N 15/12, 15/63, C07K 14/435, C12N 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/68, C07K 16/18, C12P 21/08, A61K 38/17, G01N 33/53 // (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12P 21/08, C12N 1:91)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/32982</p> <p>(43) 国際公開日 1997年9月12日(12.09.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00665</p> <p>(22) 国際出願日 1997年3月5日(05.03.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/49880 1996年3月7日(07.03.96) JP 特願平8/331944 1996年12月12日(12.12.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) エーザイ株式会社(EISAI CO., LTD.)(JP/JP) 〒112-88 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 月田承一郎(TSUKITA, Shoichiro)(JP/JP) 〒604 京都府京都市中京区堺町二条上ル亀屋町167-502 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 古谷 馨, 外(FURUYA, Kaoru et al.) 〒103 東京都中央区日本橋堀留町1-8-11 日本橋TMビル Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: HUMAN ADHESION MOLECULE OCCLUDIN</p> <p>(54)発明の名称 ヒト接着分子オクルディン</p> <p>(57) Abstract The invention provides the total structures of mammalian homologues of occludin as a constitutive protein of tight junctions (TJ). Human, canine and mouse occluding genes have been analysed by conducting a polymerase chain reaction based on the sequence found around a neural apoptosis inhibitory gene. Further it has been confirmed that occludin is a constitutive protein of TJ by preparing the antibody and conducting immunofluorescent cell staining.</p>		

(57) 要約

タイトジャンクション (TJ) の構成タンパク質であるオクルディンの哺乳動物相同体の全構造を提供する。

神経アポトシス阻止タンパク質遺伝子の周囲にみられる配列に基づいて、PCRを実施しヒト、イヌ及びマウスのオクルディン遺伝子を解析した。さらに抗体を作成し免疫蛍光細胞染色によりTJの構成タンパク質であることを確認した。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
AZ	アゼルバイジャン	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア共和国
BB	バルバドス	GE	イギリス	MC	モナコ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MD	モルドバ	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TD	チャド
BJ	ベナン	HN	ホンジュラス	MK	マケドニア共和国	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	IE	アイルランド	ML	マリ	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CC	中東	JP	日本	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	KE	ケニア	MX	メキシコ	US	米国
CH	スイス	KZ	カザフスタン	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン共和国
CI	コート・ジボワール	KG	キルギス	NL	オランダ	VN	ベトナム
CM	カメルーン	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KK	大韓民国	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

明細書

ヒト接着分子オクルディン

技術分野

ヒト、イヌおよびマウスのタイトジャンクション (tight junction、以下「TJ」と記す) の膜タンパク質オクルディンのアミノ酸配列およびそれをコードするDNAに関する。

背景技術：

多細胞動物において、隣接する細胞との接着の情報は、細胞の増殖、分化、炎症、癌転移などの生命現象の調節、維持に深く関係している。接着に関与している細胞間接着分子は細胞表面で集合して、接着のための特殊に分化した膜領域をつくることが多い。とくに、上皮細胞において、カドヘリンなどの細胞間接着分子は、その細胞質ドメインで細胞骨格と強く結合していることが知られている。このような膜領域は、細胞間接着装置と呼ばれ、主として次の4つに分類されている。gap junction (GJ)、adherens junction (AJ)、desmosome および tight junction (TJ) である。

これら接着装置は、最初電子顕微鏡下で同定されたものであるが、構成タンパク質の解明研究により、その生理学的病理学的意義の重要性が大きな注目の的となっている。いわゆる接着分子と呼ばれるタンパク質がこれら接着装置中に特異的に存在し、AJの接着分子はカドヘリンであり現在までN-カドヘリン、P-カドヘリンなどいく種類ものカドヘリンが同定されている (Takeichi, M. et al., Science, 251, 1451-1455, 1991)。desmosome の接着分子としてはデスモグレン、デスモコリンであり、最近の研究により、その構造がカドヘリンに類似していることが判明した (Buxton, R. S. et al., J. Cell Biol., 121, 481-484, 1993)。GJの接着分子はコネキシンと呼ばれ、4個所の細胞膜貫通部位を保有し、N末端C末端とも膜の細胞質側に出ていることがわかっている。

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

TJは、上皮細胞と内皮細胞に特有の細胞間接着装置で、そこでは隣り合う細胞の細胞膜が完全に密着してみえる。TJは個々の細胞の周囲を取り巻いていて、細胞層をはさんだ管腔側と基底膜側との間の水溶性分子の透過を遮る、あるいは調節するバリアとして機能している。また、細胞膜をapical側とbasolateral側に仕切るフェンスとして働き、イオンチャンネル、ポンプなどの膜タンパク質や、脂質の細胞膜上での極性をもった分布を維持しているともいわれている (Schneeberger, E. E. et al., *Am. J. Physiol.*, 262, L647-L661, 1992)。これらの機能により、細胞層をはさんだ両側で異なる溶液組成からなる環境がつくられ、その細胞層の極性が保たれるのであり、TJは多細胞生物においてきわめて基本的な重要な構造の1つといえる。

しかしながら、TJの分子構築の解析は他の接着装置に比べて遅れており、これまでTJの接着分子そのものが同定されていなかったために、TJに関する分子生物学的研究を進めるうえで大きな障害となっていた。

本発明者はラット肝臓からのAJ分離法を確立し、この分離したAJからラディキシン、ZO-1など多くのタンパク質を同定してきた (Tsukita, Sh. et al., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4, 834-839, 1992)。ZO-1に関する研究およびAJとTJの組織学的知見から、AJ中のタンパク質はTJのタンパク質も含んでいることが予想された。そこで、ニワトリ (chick) 肝臓よりAJを分離し、このAJを抗原とするモノクローナル抗体を作製しTJと特異的に反応する抗体を用いて、TJ構成タンパク質の構造解析を行った。その結果、公知のタンパク質と類似しない新規構成タンパク質の構造解析に成功し、オクルディンと命名した

(Furuse, M. et al., *J. Cell Biol.*, 123, 1777-1788, 1993)。

このニワトリオクルディンは504個のアミノ酸からなる56KDaのタンパク質で、最大の特徴はN末端部半分に4ヶ所の膜貫通領域を有し、N末端とC末端を細胞質に向け、細胞外に2つのループを持つタンパク質である。

その後の研究によりオクルディンが、細胞レベルおよび生体全体レベルにおいてTJ生理機能の解析に重要な因子であることが推察され、非常に大きな注目を集めた。

しかしながらニワトリというヒトとかなりかけ離れた種の起源であることから、

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

それ以上全く研究は進展せず、TJの生理機構の解明および医学的解析のためにはヒト由来オクルディンの構造解析が待望された。この目的のためにこの分野において世界的な競争が行われていたにも拘わらず、未だヒトオクルディンの解明は成功していない。

発明の開示

上記現状に鑑み、本発明の目的は、ヒト、イヌおよびマウスのオクルディンのアミノ酸配列およびそれをコードするDNAを提供することにある。

Roy らはヒトneuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) の遺伝子を報告したが、その中でNAIP遺伝子の欠失体において、ニワトリオクルディンのC末端部と類似の塩基配列を保有するDNA断片が存在することを報告した (Roy, N. et al., Cell, 80, 167-178, 1995)。そこで本発明者は、この配列が実際にオクルディンのヒト相同体の一部をコードしているか否かを決定するために、ニワトリオクルディンとの類似塩基配列からプライマーを選択し、ヒト腸管上皮T84細胞株のcDNAライブラリーをPCRの鋳型として鋭意スクリーニングした結果、ヒトオクルディンの全構造解析に成功した。さらにマウスおよびイヌのオクルディン解析も完成させ、抗オクルディンモノクローナル抗体を作成し、組織染色により、TJの膜貫通型タンパク質であることを確認した。

発明を実施するための最良の形態：

本発明は、ヒト、イヌおよびマウスのオクルディンアミノ酸配列、それをコードするDNA、抗オクルディン抗体およびそれらを利用する遺伝子解析法に関するものであって、

- 1) 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するヒトオクルディンをコードするDNA、
- 2) 配列番号4に記載のヒトオクルディンをコードするDNA、
- 3) 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するイヌオクルディンをコードする、配列番号5に記載のDNA、
- 4) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するマウスオクルディンをコードする、配

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

- 列番号6に記載のDNA、
- 5) 配列番号1、2及び3に記載のアミノ酸配列を有する、それぞれ順にヒト、イヌ、マウスオクルディン、
 - 6) それぞれのオクルディンのアミノ酸配列のうち1若しくは複数のアミノ酸が、付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列を有するオクルディン改変体、及びこれら改変体をコードするDNA、
 - 7) ヒト、イヌ、マウスオクルディンおよびそれらの改変体をコードするDNAいずれかを含有するベクター、
 - 8) 前記ベクターを保持する形質転換体、
 - 9) 前記の形質転換体を培養し、発現産物を回収することを含む、それぞれのオクルディン蛋白質の製造方法、
 - 10) 配列番号4、5または6に記載の塩基配列の全部または一部を含むものからなるDNAプローブ、
 - 11) 配列番号4、5または6に記載の塩基配列の一部を含むものからなるDNAプライマー、
 - 12) ヒト、イヌ又はマウスオクルディンタンパク質と特異的に結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、
 - 13) 抗オクルディン抗体を用いることを特徴とする生体資料中のオクルディンの測定方法および測定試薬、
 - 14) 上記DNAプライマー又はDNAプローブを用いることを特徴とする生体試料中のオクルディン遺伝子の解析方法、
 - 15) オクルディンを発現している細胞と被検物質を共存させた後、該細胞のオクルディン遺伝子の発現量をDNAプライマー又はDNAプローブを用いて解析することを特徴とする、オクルディンの発現に影響を与える薬物のスクリーニング方法、
 - 16) ヒトオクルディンDNAから導かれるアンチセンスDNA、
 - 17) オクルディンDNAをノックアウトした実験動物、に関する。

発明の詳細な説明

本発明者が哺乳動物オクルディン相同体の同定に成功したことにより、TJの構

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

成や機能を構造的に且つ機能的に分子レベルで試験することができる。種々のタイプの培養したヒト、ネズミおよびイヌ (MDCK) 細胞を使用して、オクルディン遺伝子発現を調節するかまたはアンチセンスプローブ若しくは抗体でオクルディンの機能を阻害することによって、TJのバリアーおよびフェンス機能並びにこれに関与する調節メカニズムを実験的に分析することができる。例えば、オクルディンcDNAの過剰発現によって、フリーズフラクチャーレプリカに見られるTJストランド数が増加し、バリアー機能が付随的に向上するかどうかを今や決定することができる。さらに本発明により、TJの機能に影響を及ぼす薬物の簡便なスクリーニングTJの機能に影響を及ぼす薬物の簡便なスクリーニング法の樹立を可能にした。例えば、オクルディンを発現している種類の細胞を用い、検体と反応させた後、細胞のオクルディン遺伝子又はオクルディン蛋白質の発現量を測定することにより、TJの機能に影響を及ぼす薬物をスクリーニングすることができる。遺伝子の解析は、DNAプローブ又はプライマーなどを用いて行うことができる。例えば、検体試料から常法によりRNAまたはDNAを抽出し、必要に応じて前処理後、メンブレンまたはゲル上で電気泳動を行った後、ラベルしたDNAプローブとハイブリダイズさせるのノザンプロット法又はサザンプロット法、ゲノムDNAやcDNAを鋳型として、適切な位置に相当する約20塩基程度のプライマーを用いて目的DNAを増幅させるPCR法など公知の方法で行うことができる。オクルディン蛋白質は、例えば抗体を用いて定量することができる。

また、種々のタイプの突然変異およびオクルディン遺伝子ノックアウトマウスを作成することによって、TJ形成が種々の器官の形態形成にどのように関与しているのか、そしてTJの機能不全が炎症や腫瘍転移のような種々の病理学的状態に関係があるのかどうかを知ることが可能となる。TJ機能、特にそのバリアー機能の調節の可能性も医薬品の透過性に関連して興味がある。かくして、脳上皮細胞中でのオクルディン合成の上方または下方調節によって血液-脳関門を調節することが可能であろう。腸からの医薬品吸収を調節するためには腸上皮細胞内でのTJ機能の調節が必要である。このように、TJの機能を調節する薬物をスクリーニングして効果を有する物質を投与することにより、医薬品の吸収調節、特に脳内への移行を調節することが可能となる。このように本発明は、血液-脳関門を中

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

心とする生理的機構の解明、病態の解析、診断、治療に大きく期待される。

本発明のDNAは、その一部をプライマーまたはプローブとして用いることにより、オクルディンタンパク質の遺伝子解析や遺伝子の発現の解析に利用することができる。一部とは、プライマーまたはプローブとして使用するオリゴヌクレオチドが本発明のDNA配列をもとに少なくとも10個の対応する塩基配列を含むものからなり、好ましくは少なくとも15個の塩基配列、さらに好ましくは約20～30個の塩基配列を含むものからなる対応するポリヌクレオチドを意味する。またプローブとしては、さらに高分子のもの、全DNAも使用することができる。

オクルディンの機能を調節する手段の一つとして、アンチセンスDNA又はアンチセンスRNAを用いる方法がある。DNA複製、転写、翻訳などの遺伝子発現の各段階において、遺伝子の情報が読みとられなくして発現の流れを遮断する方法であって、この遮断に核酸あるいはそのアナログを用いる方法がアンチセンス法である

(Wickstrom, E., ed., *Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS*, Wiley-Liss, New York, 1991)。本発明のオクルディンDNAを解明したことにより、アンチセンス法によりオクルディンの機能を抑制させる手段を可能とした。DNAオリゴマーの長さは二重鎖形成能、膜透過性、塩基配列特異性が関係し、少なくとも6個、好ましくは少なくとも10 mer, 通常15から30 merを用いることができる。配列は本発明DNA配列に基づいて適宜選択し、実験確認することができる。通常、オリゴマーの安定性を増すために、リン酸基、糖部分、3', 5'末端に化学修飾を施させる (Cook, P. D., *Anticancer Drug Des.*, 5, 585, 1991)。代表的アナログはヌクレオシド間のホスホジエステル基の酸素原子の一つを硫黄原子に置換したオリゴホスホロサイオエート、メチル基に置換したオリゴメチルホスホネートであって、いずれもヌクレアーゼにたいしてきわめて安定となる。その他ハイブリッド二重鎖の安定性を増すためにアクリジンやポリリジンを結合させたオリゴマー、N-メチルチミジレートを含むオリゴマーなどが用いられる。これらオリゴマーは公知の化学合成法により合成することができる。また、本発明DNAから導かれるアンチセンスRNAも利用できる。

本発明のオクルディンタンパク質の全部または一部（部分）をエピトープとして用い、抗体の作成、およびその抗体を用いる研究用、診断用試薬として利用す

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

ることができる。エピトープとは、ポリペプチドの抗原決定基を意味し、一般に少なくとも6個のアミノ酸で構成され、6個のアミノ酸で構成されるポリペプチドが抗体と結合することは公知である（公表特許公報60-500684号）。本タンパク質の抗原ペプチドは、本発明のアミノ酸配列に基づいて、連続してなる少なくとも6個のアミノ酸、好ましくは連続してなる少なくとも8個のアミノ酸、より好ましくは連続してなる少なくとも約15個のアミノ酸、さらに好ましくは連続してなる少なくとも約20個のアミノ酸からなるポリペプチドを意味する。本発明のオクルディンはそのアミノ酸配列から、ニワトリオクルディンと同様にN末端部半分に4カ所の膜貫通領域を有し、N末端とC末端を細胞質に向け、細胞外に2つのループを持つ蛋白質である。ヒトオクルディンの場合、アミノ酸89～135位および196～243位部分が細胞外に位置すると予想されることから、抗原部位を目的に応じて選択することにより、各種の抗体を作成することができ、それらを使い分けることによりTJの機能解明手段、抗体によるTJ機能抑制手段として利用することができる。また、部分ペプチドは、部分ペプチドと結合性を有する化合物のスクリーニング手段として利用することも可能である。

本発明のオクルディンのアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が、付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列を有するタンパク質も本発明に含まれる。

(1) cDNAライブラリーの作製およびオクルディンの構造解析

RNAの調製は、ヒトまたは動物の細胞（株）を原料として、例えばグアニジンチオシアネート、界面活性剤、キレート剤および還元剤の混合溶液にて抽出を行った後、フェノール抽出、有機溶媒分画（Chamezynski et al., Anal. Biochem., 162, 156, 1987）、次いで密度勾配超遠心操作により行うことができる。得られたRNAを鋳型として用い、ランダムプライマー、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ等を用いるcDNA合成法（Gubler, U. et al., Gene, 25, 263, 1983）などの常法により、2本鎖DNAを調製し、得られた2本鎖DNAを、常法に従い、バクテリオファージ、例えばλzap、λgt11などに組み込みcDNAライブラリーを作製することができる。また市販のcDNAライブラリーを使用することも可能である。

次いで、Royらの報告の中で、ニワトリオクルディンC末端部と類似した塩基

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

配列をもとに適切にプライマー部位を選択し、常法の PCR法により DNAを増幅させ、サブクローニングすることにより、オクルディンDNA 由来と予想されるDNA断片を得ることができる。次いで、この断片をプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングし、単離したクローンの塩基配列を解析をすることによりオクルディン全長cDNAを得ることができる。塩基配列の構造は、マキサム・ギルバート法 (Maxam, A. M. and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560, 1977) あるいはジデオキシ法 (Sanger, F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977) によって決められる。その塩基配列をもとにアミノ酸配列が演繹される。これら遺伝子の操作は通常行われる公知の方法により実施することができ、例えばMolecular Cloning. A Laboratory Manual, T. Manitisら編集 (1989), Cold Spring Harbor Laboratoryに記載の方法に準じて行うことができる。

(2) 抗体の調製

本発明のモノクローナル抗体の調製はヒト、イヌまたはマウスのオクルディンを抗原とし、必要に応じてキャリアー蛋白との複合体を作り、これを動物に接種して免疫する。上記免疫動物の脾臓あるいはリンパ節から得られた抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合し、オクルディンに強い特異性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選択することにより調製される。その操作は従来既知の方法に準ずればよい。

免疫抗原としては天然精製品、遺伝子組換手法あるいは化学合成手法による生産品などいずれも使用できる。遺伝子組換手法によるオクルディンの調製は、オクルディンをコードするcDNAをオクルディンの発現に適したベクターのプロモーター下流に制限酵素とDNAリガーゼを用いる公知の方法により再結合して組換え発現ベクターを作製することでできる。ベクターは宿主内で複製、増幅可能であれば特に限定されない。プロモーターおよびターミネーターに関してもオクルディンをコードする塩基配列の発現に用いられる宿主に対応したものであれば特に限定されず、宿主に応じて適切な組み合わせも可能である。このようにして得られた組換え発現ベクターはコンピテント細胞法 (J. Mol. Biol., 53, 154, 1970)、リン酸カルシウム法 (Science, 221, 551, 1983)、などにより宿主に

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

導入し、形質転換体が作製される。宿主としては大腸菌および動物細胞などが用いられ、得られた形質転換体はその宿主に応じた適切な培地中で培養される。培養は通常20℃～45℃、pH5～8の範囲で行われ、必要に応じて通気、攪拌が行われる。培養物からのオクルディンの分離、精製は公知の分離、精製法を適宜組み合わせる。これらの公知の方法としては塩析、溶媒沈殿法、透析、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ、逆相高速液体クロマトグラフィなどが挙げられる。

免疫抗原オクルディンは全構造を保有していることが好ましいが、部分構造を有するフラグメントあるいはペプチドであってもよく、オクルディンの全アミノ酸配列から適宜選択することができる。フラグメントあるいはペプチドの調製は化学合成法、上記遺伝子組換え法あるいは天然物の分解の方法などが用いられる。

抗原とキャリア蛋白の複合体の調製は種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒド、カルボジイミド、マレイミド活性エステル等が使用できる。

キャリア蛋白は牛血清アルブミン、サイログロブリン、ヘモシアニン等の常用されているものでよく、通常1～5倍量の割合でカップリングさせる方法が用いられる。

免疫される動物としてはマウス、ラット、ウサギ、モルモットなどがあげられ、接種方法は皮下、筋肉あるいは腹腔内に投与される。投与に際しては完全フロイントアジュバンドや不完全フロイントアジュバンドと混和して投与してもよく、投与は通常2～5週毎に1回ずつ行われる。免疫された動物の脾臓あるいはリンパ節から得られた抗体産生細胞は骨髓腫細胞と細胞融合させられハイブリドーマとして単離される。骨髓腫細胞としてはマウス、ラット、ヒト等由来のものが使用され、抗体産生細胞と同種由来のものであることが好ましいが、異種間においても可能な場合もある。

細胞融合の操作は既知の方法、たとえばケーラーとミルスタインの方法（Nature, 256, 495, 1975）に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコールやセンダイウイルスなどが挙げられるが、通常20～50%程度の濃度のポリエチレングリコール（平均分子量1000～4000）を用いて20～40℃、好ましくは30～37℃の温度下、抗体産生細胞数と骨髓腫細胞数の比は通常1:1～10:1程度、

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

約1～10分間程度反応させることにより細胞融合を実施することができる。

抗オクルディン抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の免疫化学的方法が使用できる。たとえば、オクルディンをコートしたマイクロプレートを用いるELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法、抗免疫グロブリン抗体をコートしたマイクロプレートを用いるEIA (Enzyme immunoassay) 法、オクルディンを含むサンプルを電気泳動後ニトロセルロース転写膜を用いるウエスタンブロット法などがあげられる。

このようなウエルから更に例えば限界希釈法によってクローニングを行いクローンを得る。ハイブリドーマの選別、育種は通常HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加して、10～20%牛胎児血清を含む動物細胞用培地 (例、RPMI 1640) で行われる。このようにして得られたクローンはあらかじめプリスタンを投与したBALB/Cマウスの腹腔内へ移植し、10～14日後にモノクローナル抗体を高濃度に含む腹水を採取し、抗体精製の原料とすることができる。また、該クローンを培養し、その培養物を抗体精製の原料とすることもできる。モノクローナル抗体の回収は免疫グロブリンの精製法として既知の方法を用いればよく、たとえば、硫酸分画法、PEG分画法、エタノール分画法、陰イオン交換体の利用、さらにアフィニティクロマトグラフィなどの手段により容易に達成することができる。

本発明によって得られた抗オクルディンモノクローナル抗体を用いる免疫学的方法により生体試料中のオクルディンの定性、定量を行うことができる。免疫学的方法としては、生体試料を必要に応じて適切に処理、たとえば細胞の分離、抽出操作などした試料について、免疫組織染色法、酵素免疫測定法、凝集法、競合法、サンドイッチ法など既知の方法を適用することができる。免疫組織染色法は、例えば標識化抗体を用いる直接法、該抗体に対する抗体の標識化されたものを用いる間接法などにより行ないえる。標識化剤としては蛍光物質、放射性物質、酵素、金属、色素など公知の標識物質はいずれも使用できる。

本発明のモノクローナル抗体はFc'あるいはFc領域を除去したFab'あるいはFab画分、あるいはその重合体を用いてもよい。またそのキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体であってもよい。

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

実施例

以下の実施例により本発明を詳細に且つ具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1. ヒトオクルディンの構造解析

ヒトNAIP欠損遺伝子の一部に見られる、ニワトリオクルディンC末端部と類似している塩基配列をもとに、配列番号7および8に記載のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、PCRを実施した。 λ gt11 cDNA ライブラリーはヒト腸管上皮細胞下部T84を原料としてpoly(A)+RNA を精製し、TimeSaver cDNA synthesis kit (商品名、ファルマシア LKBバイオテクノロジー社製) およびGAPACK II Packaging Extract (ストラテジーン社) を用いて作製した。このライブラリーをPCRの鋳型として上記二つのプライマーを用いてPCRを実施した結果、363bp cDNA断片が得られた。

この DNA断片を DIG labeling kit (商品名、ベーリンガーマンハイム社製) を用いて、DIGラベルした後、これをプローブとして同ライブラリーをスクリーニングした。その結果、3個のcDNAクローンを単離し、これらのインサート部位を切り出し、pBluescript SK(-) にサブクローニングした。このうち、phOc6とphOc16 のクローンは全ORFを含むと予想されたので、この二つのクローン両鎖の塩基配列を解析した結果、ヒトオクルディン全構造をコードする塩基配列であることを確認した。塩基配列は7-deaza Sequenase Version Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (商品名、アプライドバイオシステム社製) を用いて決定した。配列番号4に塩基配列を、それから演繹されるアミノ酸配列を配列番号1に示した。

なお、イヌおよびマウスのオクルディンの構造についても上記と同じ手法により、イヌ腎細胞(MDCK)およびマウス肺細胞から作製した、それぞれ λ gt11および λ gt10 cDNA ライブラリーを用いて決定した。イヌオクルディンの塩基配列およびアミノ酸配列は配列番号5および2に、マウスオクルディンの塩基配列およびアミノ酸配列は配列番号6および3に示した。なお、ヒトオクルディンcDNAを含有する Escherichia Coli JM 109は1996年3月15日、受託番号 FERM BP-5477として通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(あて名: 日本国茨城県つくば市東

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

1丁目1番3号（郵便番号305））に寄託された。

実施例2. 抗ヒトオクルディンモノクローナル抗体の作製

実施例1に記載の、配列番号4を含むpBluescript SK(-)ベクターを、制限酵素 Ssp I とEcoR I（いずれも宝酒造）によって切断して、ヒトオクルディンのC末端側細胞質領域をコードするcDNA断片を得た。これをpGEX-3Xベクターに導入し、このベクターで形質転換した大腸菌を培養し、GST融合タンパク質として調製した。この融合タンパク質を抗原としてラットに免疫し、モノクローナル抗体を作製した。

免疫はラットの後足肉趾に 300 μ g/回を一度目は完全フロインドアジュバンドと混和して行い、さらに2回（1度目の免疫から3日後と7日後）抗原のみを投与した。最終免疫の翌日、免疫動物から鼠蹊部リンパ節を取り出し細胞融合に用いた。

ラットのリンパ球とマウスミエローマP3とを 2.5 : 1の割合で混和し、ケーラーらの方法を一部改変して、1gのポリエチレングリコール（平均分子量4000）を1 mlのRPMI培地に溶解したものをを用いて2分間反応させることにより細胞融合を行った。融合細胞を24ウェルプレートに植え込み、10%のHCF（ボクスイ・ブラウン社製）を含むHAT培地で9日間培養後HT培地に移行し、更にフラスコで培養できるようになってからRPMIで培養した。増殖の見られたウェルの培養上清中の抗体価をヒト腸管上皮細胞株T84に対するイムノブロットと蛍光抗体染色で検定し、適正なウェルから限界希釈法により求めるハイブリドーマのクローニングを行った。マイクロタイタープレートに計算上7個/ウェルとなるようにハイブリドーマを植え込み、イムノブロット法にてスクリーニングしクローン株を確認し単離した。該ハイブリドーマの培養液より常法により抗体を精製した。

実施例3. 細胞染色

ヒト腸管上皮細胞を3%ホルマリンPBSで室温で15分固定し、更に室温で0.2 % Triton X-100PBS中で15分処理した。試料を1%BSAでブロックした後に検体を加え、室温で30分反応させた。洗浄後FITC標識の抗ラット免疫グロブリン抗体を加え室温で30分反応させ、未反応の抗体を洗浄後蛍光顕微鏡で検鏡を行った。

TJ関連タンパク質ZO-1に対するモノクローナル抗体と本発明の抗ヒトオクルデ

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

インモノクロナール抗体による二重免疫蛍光染色の結果を図に示した。ZO-1（文献）と全く同一染色パターンが見られたことから、本発明のヒトタンパク質は、TJの接着分子オクルディンのヒトにおけるホモログであることが証明された。

実施例4. 脳血管細胞におけるオクルディンの発現

脳血管内皮細胞は、末梢血管内皮細胞と異なり、高電気抵抗TJを有しており、高電気抵抗TJは脳一血液関門を形成していると考えられていることから、高電気抵抗TJを有する培養豚脳血管内皮細胞（PBEC）と低電気抵抗TJを有する培養豚大動脈内皮細胞（PAEC）のオクルディンの分布、発現を検討した。

豚オクルディンcDNA断片は、ヒトオクルディンDNA配列（配列番号4）の1359-1391位センス鎖（配列番号7）および1692-1721位アンチセンス鎖（配列番号8）をプライマーとしてPCR法により増幅し363塩基断片を調製した。該断片の塩基配列を解析に基づく、そのコードするアミノ酸配列はヒト、マウス、イヌオクルディンのアミノ酸配列と高い相同性を示し、豚オクルディンのcDNAであることを確認した。³²Pラベルした該断片をプローブとして使用した。

培養細胞からのmRNAの調製はRNA分離キット（ストラタジーン社（Stratagene）製）を使用し、アガロースゲル電気泳動後ニトロセルロース膜に転写し、高ストリンジент条件下でプローブとハイブリダイズさせた。その結果、オクルディンmRNAはPBECにおいて訳2.4kbに強いバンドが認められたが、PAECにおいては、同位置に非常に弱いバンドしか認められなかった。

ついで哺乳類オクルディンを特異的に認識するモノクローナル抗体として抗マウスオクルディン抗体を、及びTJ関連蛋白質ZO-1にたいする抗体を用いオクルディンの発現を比較した。

ラット抗マウスオクルディン抗体は、マウスオクルディンとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合蛋白質を抗原として作製し、該抗体の検出はFITC標識羊抗ラットIgG抗体を用いた。培養細胞の破碎抽出物の同一蛋白質量を一次元ゲル電気泳動後、イムノプロット法で検出したところ、PBECにおいては約58KDの位置に強く検出されたが、PAECにおいては、それに比較してかなり弱く検出された。

一方、ZO-1の発現は2つの細胞で明らかな差は認めなかった。免疫染色ではイムノプロットと同様にPBECではオクルディンは高度に発現し、細胞間に連続性に

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

ZO-1と同一の局在を示した。一方、PAECではまたオクルディンの検出は困難であり、ZO-1は細胞間に不連続に局在した。これらの結果はPBECにおけるオクルディンの相対的に高度な発現は高電気抵抗TJの形成に必要であることが示唆され、オクルディンがTJ構成蛋白質であることを立証したものである。

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

配列表

配列番号: 1

配列の長さ: 522

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

起源

生物名: ヒト (腸管上皮細胞株 T84)

配列の記述

Met Ser Ser Arg Pro Leu Glu Ser Pro Pro Pro Tyr Arg Pro Asp Glu

1 5 10 15

Phe Lys Pro Asn His Tyr Ala Pro Ser Asn Asp Ile Tyr Gly Gly Glu

20 25 30

Met His Val Arg Pro Met Leu Ser Gln Pro Ala Tyr Ser Phe Tyr Pro

35 40 45

Glu Asp Glu Ile Leu His Phe Tyr Lys Trp Thr Ser Pro Pro Gly Val

50 55 60

Ile Arg Ile Leu Ser Met Leu Ile Ile Val Met Cys Ile Ala Ile Phe

65 70 75 80

Ala Cys Val Ala Ser Thr Leu Ala Trp Asp Arg Gly Tyr Gly Thr Ser

85 90 95

Leu Leu Gly Gly Ser Val Gly Tyr Pro Tyr Gly Gly Ser Gly Phe Gly

100 105 110

Ser Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr

115 120 125

Gly Gly Tyr Thr Asp Pro Arg Ala Ala Lys Gly Phe Met Leu Ala Met

130 135 140

Ala Ala Phe Cys Phe Ile Ala Ala Leu Val Ile Phe Val Thr Ser Val

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

145 150 155 160
 Ile Arg Ser Glu Met Ser Arg Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Ser Val Ile
 165 170 175
 Ile Val Ser Ala Ile Leu Gly Ile Met Val Phe Ile Ala Thr Ile Val
 180 185 190
 Tyr Ile Met Gly Val Asn Pro Thr Ala Gln Ser Ser Gly Ser Leu Tyr
 195 200 205
 Gly Ser Gln Ile Tyr Ala Leu Cys Asn Gln Phe Tyr Thr Pro Ala Ala
 210 215 220
 Thr Gly Leu Tyr Val Asp Gln Tyr Leu Tyr His Tyr Cys Val Val Asp
 225 230 235 240
 Pro Gln Glu Ala Ile Ala Ile Val Leu Gly Phe Met Ile Ile Val Ala
 245 250 255
 Phe Ala Leu Ile Ile Phe Phe Ala Val Lys Thr Arg Arg Lys Met Asp
 260 265 270
 Arg Tyr Asp Lys Ser Asn Ile Leu Trp Asp Lys Glu His Ile Tyr Asp
 275 280 285
 Glu Gln Pro Pro Asn Val Glu Glu Trp Val Lys Asn Val Ser Ala Gly
 290 295 300
 Thr Gln Asp Val Pro Ser Pro Pro Ser Asp Tyr Val Glu Arg Val Asp
 305 310 315 320
 Ser Pro Met Ala Tyr Ser Ser Asn Gly Lys Val Asn Asp Lys Arg Phe
 325 330 335
 Tyr Pro Glu Ser Ser Tyr Lys Ser Thr Pro Val Pro Glu Val Val Gln
 340 345 350
 Glu Leu Pro Leu Thr Ser Pro Val Asp Asp Phe Arg Gln Pro Arg Tyr
 355 360 365
 Ser Ser Gly Gly Asn Phe Glu Thr Pro Ser Lys Arg Ala Pro Ala Lys
 370 375 380

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

Gly Arg Ala Gly Arg Ser Lys Arg Thr Glu Gln Asp His Tyr Glu Thr
 385 390 395 400
 Asp Tyr Thr Thr Gly Gly Glu Ser Cys Asp Glu Leu Glu Glu Asp Trp
 405 410 415
 Ile Arg Glu Tyr Pro Pro Ile Thr Ser Asp Gln Gln Arg Gln Leu Tyr
 420 425 430
 Lys Arg Asn Phe Asp Thr Gly Leu Gln Glu Tyr Lys Ser Leu Gln Ser
 435 440 445
 Glu Leu Asp Glu Ile Asn Lys Glu Leu Ser Arg Leu Asp Lys Glu Leu
 450 455 460
 Asp Asp Tyr Arg Glu Glu Ser Glu Glu Tyr Met Ala Ala Ala Asp Glu
 465 470 475 480
 Tyr Asn Arg Leu Lys Gln Val Lys Gly Ser Ala Asp Tyr Lys Ser Lys
 485 490 495
 Lys Asn His Cys Lys Gln Leu Lys Ser Lys Leu Ser His Ile Lys Lys
 500 505 510
 Met Val Gly Asp Tyr Asp Arg Gln Lys Thr
 515 520

配列番号 : 2

配列の長さ : 521

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : イヌ (腎細胞MDCK)

配列の記述

Met Ser Ser Arg Pro Phe Glu Ser Pro Pro Pro Tyr Arg Pro Asp Glu
 1 5 10 15

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

Phe Lys Pro Asn His Tyr Ala Pro Ser Asn Asp Val Tyr Gly Gly Asp
 20 25 30
 Met His Val Arg Pro Met Leu Ser Gln Pro Ala Tyr Ser Phe Tyr Pro
 35 40 45
 Glu Asp Glu Ile Leu His Phe Tyr Lys Trp Thr Ser Pro Pro Gly Val
 50 55 60
 Ile Arg Ile Leu Ser Met Leu Val Ile Val Met Cys Ile Ala Ile Phe
 65 70 75 80
 Gly Cys Val Ala Ser Thr Leu Ala Trp Asp Arg Gly Tyr Gly Thr Gly
 85 90 95
 Leu Met Gly Gly Ser Ile Gly Tyr Pro Tyr Gly Ser Gly Phe Gly Ser
 100 105 110
 Tyr Gly Thr Gly Tyr Gly Tyr Gly Phe Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly
 115 120 125
 Gly Tyr Thr Asp Pro Arg Ala Ala Lys Gly Phe Leu Leu Ala Met Val
 130 135 140
 Ala Phe Cys Phe Ile Ala Ala Leu Val Ile Phe Val Thr Ser Val Ile
 145 150 155 160
 Arg Ser Asp Ile Ser Arg Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Thr Val Ile Ile
 165 170 175
 180 185 190
 Ile Met Gly Val Asn Pro Thr Ala Gln Ala Ser Gly Ser Leu Tyr Ser
 195 200 205
 Ser Gln Ile Tyr Ala Met Cys Asn Gln Phe Tyr Ala Ser Thr Ala Thr
 210 215 220
 Gly Leu Tyr Met Asp Gln Tyr Leu Tyr His Tyr Cys Val Val Asp Pro
 225 230 235 240
 Gln Glu Ala Ile Ala Ile Val Leu Gly Phe Met Val Ile Val Ala Phe
 245 250 255

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

Ala Leu Ile Ile Phe Phe Ala Val Lys Thr Arg Arg Lys Met Asp Arg
 260 265 270
 Tyr Asp Lys Ser Asn Ile Leu Trp Asp Lys Glu His Ile Tyr Asp Glu
 275 280 285
 Gln Pro Pro Asn Val Glu Glu Trp Val Lys Asn Val Ser Ala Gly Thr
 290 295 300
 Gln Asp Met Pro Pro Pro Pro Ser Asp Tyr Val Glu Arg Val Asp Ser
 305 310 315 325
 Pro Met Ala Tyr Ser Ser Asn Gly Lys Val Asn Asp Lys Arg Leu Tyr
 325 330 335
 Pro Glu Ser Ser Tyr Lys Ser Thr Pro Val Pro Glu Val Val Gln Glu
 340 345 350
 Leu Pro Ala Thr Ser Pro Ala Asp Asp Phe Arg Gln Pro Arg Tyr Ser
 355 360 365
 Ser Ser Gly His Leu Glu Pro Pro Ser Lys Arg Ala Pro Ser Lys Gly
 370 375 380
 Arg Thr Gly Arg Pro Lys Arg Leu Glu Gln Asp His Tyr Glu Thr Asp
 385 390 395 400
 Tyr Thr Thr Gly Gly Glu Ser Cys Asp Glu Leu Glu Glu Asp Trp Ile
 405 410 415
 Arg Glu Tyr Pro Pro Ile Thr Ser Asp Gln Gln Arg Gln Leu Tyr Lys
 420 425 430
 Arg Asn Phe Asp Thr Gly Leu Gln Glu Tyr Lys Ser Leu Gln Ala Glu
 435 440 445
 Leu Asp Glu Ile Asn Lys Glu Leu Ser Arg Leu Asp Lys Glu Leu Asp
 450 455 460
 Asp Tyr Arg Glu Glu Ser Glu Glu Tyr Met Ala Ala Ala Asp Glu Tyr
 465 470 475 480
 Asn Arg Leu Lys Gln Val Lys Gly Ser Pro Asp Tyr Lys Asn Lys Arg

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

485 490 495
 Asn Tyr Cys Lys Gln Leu Lys Ser Lys Leu Ser His Ile Lys Lys Met
 500 505 510
 Val Gly Asp Tyr Asp Arg Gln Lys Thr
 515 520

配列番号 : 3

配列の長さ : 521

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : マウス (肺細胞)

配列の記述

Met Ser Val Arg Pro Phe Glu Ser Pro Pro Pro Tyr Arg Pro Asp Glu
 1 5 10 15
 Phe Lys Pro Asn His Tyr Ala Pro Ser Asn Asp Met Tyr Gly Gly Glu
 20 25 30
 Met His Val Arg Pro Met Leu Ser Gln Pro Ala Tyr Ser Phe Tyr Pro
 35 40 45
 Glu Asp Glu Ile Leu His Phe Tyr Lys Trp Thr Ser Pro Pro Gly Val
 50 55 60
 Ile Arg Ile Leu Ser Met Leu Ile Ile Val Met Cys Ile Ala Ile Phe
 65 70 75 80
 Ala Cys Val Ala Ser Thr Leu Ala Trp Asp Arg Gly Tyr Gly Thr Gly
 85 90 95
 Leu Phe Gly Gly Ser Leu Asn Tyr Pro Tyr Ser Gly Phe Gly Tyr Gly
 100 105 110
 Gly Gly Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Gly

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

115 120 125
 Tyr Thr Asp Pro Arg Ala Ala Lys Gly Phe Leu Leu Ala Met Ala Ala
 130 135 140
 Phe Cys Phe Ile Ala Ser Leu Val Ile Phe Val Thr Ser Val Ile Arg
 145 150 155 160
 Ser Gly Met Ser Arg Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Ile Val Ile Ile Val
 165 170 175
 Ser Ala Ile Leu Gly Ile Met Val Phe Ile Ala Thr Ile Val Tyr Ile
 180 185 190
 Met Gly Val Asn Pro Thr Ala Gln Ala Ser Gly Ser Met Tyr Gly Ser
 195 200 205
 Gln Ile Tyr Met Ile Cys Asn Gln Phe Tyr Thr Pro Gly Gly Thr Gly
 210 215 220
 Leu Tyr Val Asp Gln Tyr Leu Tyr His Tyr Cys Val Val Asp Pro Gln
 225 230 235 240
 Glu Ala Ile Ala Ile Val Leu Gly Phe Met Ile Ile Val Ala Phe Ala
 245 250 255
 Leu Ile Ile Phe Phe Ala Val Lys Thr Arg Arg Lys Met Asp Arg Tyr
 260 265 270
 Asp Lys Ser Asn Ile Leu Trp Asp Lys Glu His Ile Tyr Asp Glu Gln
 275 280 285
 Pro Pro Asn Val Glu Glu Trp Val Lys Asn Val Ser Ala Gly Thr Gln
 290 295 300
 Asp Met Pro Pro Pro Pro Ser Asp Tyr Ala Glu Arg Val Asp Ser Pro
 305 310 315 320
 Met Ala Tyr Ser Ser Asn Gly Lys Val Asn Gly Lys Arg Ser Tyr Pro
 325 330 335
 Glu Ser Phe Tyr Lys Ser Thr Pro Leu Val Pro Glu Val Ala Gln Glu
 340 345 350

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

Ile Pro Leu Thr Leu Ser Val Asp Asp Phe Arg Gln Pro Arg Tyr Ser
 355 360 365
 Ser Asn Gly Asn Leu Glu Thr Pro Ser Lys Arg Ala Pro Thr Lys Gly
 370 375 380
 Lys Ala Gly Lys Gly Lys Arg Thr Asp Pro Asp His Tyr Glu Thr Asp
 385 390 395 400
 Tyr Thr Thr Gly Gly Glu Ser Cys Glu Glu Leu Glu Glu Asp Trp Val
 405 410 415
 Arg Glu Tyr Pro Pro Ile Thr Ser Asp Gln Gln Arg Gln Leu Tyr Lys
 420 425 430
 Arg Asn Phe Asp Ala Gly Leu Gln Glu Tyr Lys Ser Leu Gln Ala Glu
 435 440 445
 Leu Asp Asp Val Asn Lys Glu Leu Ser Arg Leu Asp Lys Glu Leu Asp
 450 455 460
 Asp Tyr Arg Glu Glu Ser Glu Glu Tyr Met Ala Ala Ala Asp Glu Tyr
 465 470 475 480
 Asn Arg Leu Lys Gln Val Lys Gly Ser Ala Asp Tyr Lys Ser Lys Arg
 485 490 495
 Asn Tyr Cys Lys Gln Leu Lys Ser Lys Leu Ser His Ile Lys Arg Met
 500 505 510
 Val Gly Asp Tyr Asp Arg Arg Lys Pro
 515 520

配列番号 : 4

配列の長さ : 2 3 7 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c DNA

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

起源

生物名：ヒト（腸管上皮細胞株 T84）

配列の特徴

特徴を表す記号：m a t p e p t i d e

存在位置：168...1733

配列の記述

```
CTCCGCGTC CACCTCTCCC TCCCTGCTTC CTCTGGCGGA GCGGCAGGA ACAGAGACC 60
AGGTCCAGAG CGCCGAGGAG CCGGTCTAGG ACGCAGCAGA TTGGTTTATC TTGGAAGCTA 120
AAGGGCATTG CTCATCCTGA AGATCAGCTG ACCATTGACA ATCAGCCATG TCATCCAGGC 180
CTCTTGAAAG TCCACCTCCT TACAGGCTG ATGAATTCAA ACCGAATCAT TATCACCAG 240
GCAATGACAT ATATGGTGGA GAGATGCATG TTGACCAAT GCTCTCTCAG CCACCTACT 300
CTTTTTACCC AGAAGATGAA ATTCTTCACT TCTACAAATG GACCTCTCCT CCAGGAGTGA 360
TTGGATCCT GTCTATGCTC ATTATTGTGA TGTGCATTGC CATCTTTGCC TGTGTGGCCT 420
CCACGCTTGC CTGGGACAGA GGCTATGGAA CTTCCTTTT AGGAGGTAGT GTAGGCTACC 480
CTTATGGAGG AAGTGGCTTT GGTAGCTACG GAAGTGGCTA TGGCTATGGC TATGTTATG 540
GCTATGGCTA CGGAGGCTAT ACAGACCCAA GAGCAGCAAA GGGCTTCATG TTGGCCATGG 600
CTGCCTTTGG TTTCATTGCC GCGTTGGTGA TCTTTGTTAC CAGTGTATA AGATCTGAAA 660
TGTCCAGAAC AAGAAGATAC TACTTAAGTG TGATAATAGT GAGTGCTATC CTGGCCATCA 720
TGGTGTATAT TGCCACAATT GTCTATATAA TGGGAGTGAA CCCAACTGCT CAGTCTTCTG 780
GATCTCTATA TGGTTCACAA ATATATGCCC TCTGCAACCA ATTTTATACA CCTGCAGCTA 840
CTGGACTCTA CGTGGATCAG TATTTGTATC ACTACTGTGT TGTGGATCCC CAGGAGGCCA 900
TTGCCATTGT ACTGGGGTTC ATGATTATTG TGGCTTTTGC TTTAATAATT TTCTTTGCTG 960
TGAAAACCTG AAGAAAGATG GACAGGTATG ACAAGTCAA TATTTTGTGG GACAAGGAAC 1020
ACATTTATGA TGAGCAGCCC CCCAATGTCG AGGAGTGGGT TAAAAATGTG TCTGCAGGCA 1080
CACAGGACGT GCCTTCACCC CCATCTGACT ATGTGGAAG AGTTGACAGT CCCATCGCAT 1140
ACTCTTCCAA TGGCAAAGTG AATGACAAGC GGTTTTATCC AGAGTCTTCC TATAAATCCA 1200
CGCCGGTTCC TGAAGTGGTT CAGGAGCTTC CATTAAGTTC GCCTGTGGAT GACTTCAGGC 1260
AGCCTCGTTA CAGCAGCGGT GGTAAGTTG AGACACCTTC AAAAAGAGCA CGTGCAAAGG 1320
GAAGAGCAGG AAGGTCAAAG AGAACAGAGC AAGATCACTA TGAGACAGAC TACACAAGTG 1380
```

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

GCGGCGAGTC CTGTGATGAG CTGGAGGAGG ACTGGATCAG GGAATATCCA CCTATCACTT 1440
CAGATCAACA AAGACAACTG TACAAGAGGA ATTTTGACAC TGGCCTACAG GAATACAAGA 1500
GCTTACAATC AGAAGTTGAT GAGATCAATA AAGAACTCTC CCGTTTGGAT AAAGAATTGG 1560
ATGACTATAG AGAAGAAAGT GAAGAGTACA TGGCTGCTGC TGATGAATAC AATAGACTGA 1620
AGCAAGTGAA GGGATCTGCA GATTACAAAA GTAAGAAGAA TCATTGCAAG CAGTTAAAGA 1680
GCAAATTGTC ACACATCAAG AAGATGGTTG GAGACTATGA TAGACAGAAA ACATAGAAGG 1740
CTGATGCCAA GTTGTTTGAG AAATTAAGTA TCTGACATCT CTGCAATCTT CTCAGAAGGC 1800
AAATGACTTT GGACCATAAC CCCGGAAGCC AAACCTCTGT GAGCATCACA AAGTTTGGT 1860
TGCTTTAACA TCATCAGTAT TGAAGCATTT TATAAATCGC TTTTGATAAT CAACTGGGCT 1920
GAACACTCCA ATTAAGGATT TTATGCTTTA AACATTGGTT CTTGTATTAA GAATGAAATA 1980
CTGTTTGAGG TTTTAAAGCC TTAAGGAAG GTTCTGGTGT GAACTAACT TTCACACCCC 2040
AGACGATGTC TTCATACCTA CATGTATTTG TTGTCATAGG TGATCTCATT TAACTCTCTC 2100
AACCACCTTT CAGATAACTG TTATTATATA TCACTTTTTT CCACATAAGG AAACCTGGTT 2160
CCTGCAATGA AGTCTCTGAA GTGAACTGC TTGTTTCCTA GCACACACTT TTGGTTAAGT 2220
CTGTTTTATG ACTTCATTAA TAATAAATTC CCTGGCCTTT CATATTTTAG CTACTATATA 2280
TGTGATGATC TACCAGCCTC CCTATTTTTT TTCTGTTATA TAAATGGTTA AAAGAGGTTT 2340
TTCTTAAATA ATAAAGATCA TGTAAGAGTA AAAAAAAAAA 2379

配列番号 : 5

配列の長さ : 1961

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : イヌ (腎細胞株MDCK)

配列の特徴

特徴を表す記号 : m a t p e p t i d e

存在位置 : 72...1624

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

配列の記述

CAGGTTGGCT TATTTTGGGG AGCTCTGGGA TCCTGCTCGT CCTGAAGATC GGGTGATCAT 60
TGACATCAGC CATGTCATCG AGGCCTTTTG AGAGTCCACC TCCGTATAGA CCTGATGAAT 120
TCAAACCCAA TCATTATGCA CCGAGCAATG ATGTGTACGG TGGGGACATG CACGTCOGAC 180
CCATGCTCTC TCAGCCGGCG TATTCTTTCT ACCCAGAAGA TGAAATTCTT CACTTCTACA 240
AATGGACCTC TCCTCCAGGA GTAATTGGGA TTCTGTCCAT GCTTGTCAAT GTGATGTGCA 300
TCGCCATATT TGGCTGTGTC GCGTCCACGC TCGCCTGGGA TAGAGGCTAT GGAAGTGGGT 360
TAATGGGTGG TAGCATAGGC TACCCTTACG GAAGTGGCTT CGGGAGCTAC GGGAGTGGGT 420
ACGGCTACGG GTTTGGCTAC GGCTACGGCT ACGGCGGCTA CACGGATCCC AGAGCAGCAA 480
AGGGCTTCCT CCTGGCCATG GTGGCCTTTT GTTTTATCGC TGCATTGGTG ATAATTGTTA 540
CCAGCGTTAT AAGGTCTGAC ATATCCAGAA CCAGAAGGTA CTAATTGACT GTAATAATAC 600
TGAGTGCCTT CCTGGGCGTC ATGATGTTCA TTGCTACAAT TGTCTATATA ATGGGAGTCA 660
ATCCAAGTGC CCAGGCTTCT GGGTCTTTAT ACAGTTCACA GATATATGCC ATGTGCAACC 720
AGTTCTATGC ATCTACAGCT ACCGGACTCT ACATGGATCA GTATTTGTAT CACTACTGTG 780
TGGTGGATCC CCAAGAGGCA ATTGCCATTG TCCTGGGATT CATGGTGATT GTGGCTTTTG 840
CTTAATAAT TTTCTTTGCT GTGAAAAC TC GAAGAAAGAT GGACCGGTAT GACAAGTCCA 900
ATATATTGTG GGACAAGGAA CATATTTATG ATGAACAACC CCCCAATGTT GAAGAGTGGG 960
TTAAAAACGT TTCTGCAGGC ACACAAGACA TGCTCCTCC CCCTTCTGAC TATGTGAGAA 1020
GAGTGGACAG TCCCATGGCG TACTCTTCCA ATGGTAAAGT GAATGACAAG CGGTCTATCT 1080
CAGAGTCTTC CTATAAATCA ACACGGGTCC CCGAAGTGGT GCAGGAGCTG CCGGECACCT 1140
CCCCTGGGA TGAATTCAGG CAGCCTCGCT ACAGCAGCAG CGGGCACTTG GAGGCACTT 1200
CGAAGAGGGC CCCCTGAAA GGAAGAACGG GAAGGCCAA GAGGCTGGAG CAGGACACT 1260
ATGAGACAGA CTACACGAG GGGGGGAGT CGTGTGACGA GCTGGAGGAG GACTGGATCA 1320
GGGAATATCC ACCTATCACT TCAGATCAAC AAAGACAAC CTACAAGAGA AATTTTACAA 1380
CTGGCCTGCA GGAATACAAG AGCTTACAAG CAGAAGTGA TGAGATCAAT AAAGAAGTCT 1440
CTCGCCTGGA TAAAGAATTG GATGACTATA GAGAAGAAAG TGAAGAGTAC ATGGCTCTG 1500
CTGATGAGTA CAATAGACTG AAGCAAGTTA AGGGATCTCC AGATTACAAA AATAAGAGGA 1560
ATTATTGCAA GCAGTTGAAG AGCAAATTGT CCCACATCAA GAAGATGGTT GGAGACTATG 1620
ATAGACAGAA AACATAGAAG GCAGATGCCA CACAGTTGA GAGATTGTGA AGTATTTCAC 1680

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

ATATCTGCAA CGTTGTCAGA AGGCAGAATG ACTTTGGATT TCGAACCCAG GAGGCCAGAT 1740
 CTTTGTGATC ATTACAAAGT TTTGGTAGCT TTAATATCAT CAGTATTGAA GCATTTTACA 1800
 CATAGCTTTT GATAATCAAC TGGGCTGAAC ACTCCCGATT AAGGATTCTG TGCTTTAGAC 1860
 TTTGGCTGTT GTGCTAAAGG ACTGAGTATA GGTGGAGGTT TTCAGACCTT GGAAGAAGGT 1920
 CCCACCGTGA ACTTGTGCTG TGAACCTTGA CACTTGGGGC A 1961

配列番号 : 6

配列の長さ : 2 8 3 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : マウス (肺細胞)

配列の特徴

特徴を表す記号 : m a t p e p t i d e

存在位置 : 2 2 3 . . 1 7 8 5

配列の記述

GGAGTTTCAG GTGAATGGGT CACCGAGGGA GGAGGCTGGC CACGCCACAC CTCGTGCTA 60
 GTGCCACCT CCCGGCCCT CTTTCCTAG GCGACAGCGG TGGAGTTGCG GGAGACCGGT 120
 CCAGCGCAG GAGCAACCGG CTAGGGGCTC GGCAGGTTG CTTATCTTGG GAGCCTGGAC 180
 ATTTTGCTCA TCATAAAGAT TAGGTGACCA GTGACATCAG CCATGTCCGT GAGGCCTTTT 240
 GAAAGTCCAC CTCCTTACAG ACCTGATGAA TTCAAACCCA ATCATTATGC ACCAAGCAAT 300
 GACATGTATG GCGGAGAGAT GCATGTCCGG CCGATGCTCT CTCAGCCAGC GTACTCTTTT 360
 TATCCGGAAG ATGAAATTCT TCACTTCTAC AAATGGAAGT CGCCCCCAGG GGTGATCCGG 420
 ATCCTGTCTA TGCTCATTAT TGTGATGTGC ATGCCATAT TTGCCTGTGT GGCTTCCACA 480
 CTTGCTTGGG ACAGAGGCTA TGGGACAGGG CTCTTTGGAG GAAGCCTAAA CTACCTTAT 540
 AGTGGCTTTG GCTACGGAGG TGGCTATGGA GGCGGCTATG GAGGCTATGG CTATGGCTAT 600
 GGCGGATATA CAGACCCAAG AGCAGCCAAA GGCTTCCTGT TGGCCATGGC AGCCTTCTGC 660

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

TTCATCGCTT CCTTAGTAAT ATTTGTGACC AGTGTATAA GATCTGGAAT GTCCAGGACA 720
AGAAGATATT ACTTGATCGT GATCATAGTC AGCGCTATCC TGGGCATCAT CAGTGTATT 780
GCCACGATCG TGTACATAAT GGGAGTGAAC CCGACGGCCC AGGCTTCTGG ATCTATGTAC 840
GGCTCACAGA TATATATGAT CTGCAACCAG TTTTATACTC CTGGAGGTAC TGGTCTCTAC 900
GTGGATCAAT ATTTGTATCA CTACTGTGTG GTTGATCCCC AGGAGGCTAT AGCCATTGTC 960
CTGGGGTTCA TGATTATCGT GGCTTTTGCT TTAATCATCT TTTTGTCTGT GAAAACCCGA 1020
AGAAAGATGG ATCGGTATGA TAAGTCCAAT ATTTGTGGG ATAAGGAACA CATTATGAT 1080
GAACAGCCCC CCAATGTTGA AGAGTGGGT AAAAATGTGT CTGCAGGCAC ACAGGACATG 1140
CCTCCACCCC CATCTGACTA TCGGAAAGA GTTGACAGTC CAATGGCCTA CTCTCCAAT 1200
GGCAAAGTGA ATGGCAAGCG ATCATACCCA GAGTCTTCT ATAAGTCAAC ACCTCTGGTG 1260
CCTGAAGTGG CCCAGGAGAT TCCTCTGACC TTGAGTGTGG ATGACTTCAG GCAGCCTCGG 1320
TACAGCAGCA ATGGTAACCT AGAGACACCT TCTAAAAGGG CTCCCACGAA GGGGAAAGCA 1380
GGAAAGGGCA AGAGGACGGA CCTGACCAC TATGAAACAG ACTACAGGAC AGGTGGGGAG 1440
TCCTGCGAGG AGCTGGAGGA GGACTGGGTC AGGGAATATC CACCTATCAC TTCAGATCAA 1500
CAAAGACAAC TCTACAAGAG AAATTTTGAT GCAGGTCTGC AGGAGTATAA GAGGTACAG 1560
GCAGAACTAG ACGACGTCAA TAAAGAGCTC TCTCGTCTAG ATAAAGAGCT GGATGACTAC 1620
AGAGAGGAGA GTGAAGAGTA CATGGCTGCT GCTGATGAAT ATAATAGACT AAAGCAAGTT 1680
AAGGGATCTG CAGATTATAA AAGTAAGAGG AATTACTGCA AGCAGTTGAA GAGCAAATTA 1740
TCGCACATCA AGAGGATGGT GGGAGACTAT GACAGACGGA AACCTTAGAG AGATGCCAGT 1800
TGCGGGAGAA GGGAGAGGTG CATCTGCCTG CAGGATGTCT CTGCAATTCT CTCCAGAGGC 1860
AACTGACTT TGGACTCTAA TCTGGGAAGT TAAAACCTTG TGATCATTAC AAAGTTTCCA 1920
TGGCTTTAAT TCCATCAGTT TCCTATCTCC AGTATTGAAG CATTITTATAA ATGGCTTTTG 1980
ATAATTGACT GGGCTGAACA CTCCAATTAA GGATTTTACA GTTCAACAT TGATTCTTGT 2040
ATTAAGAATT AAAATGTTGC TTGAGGTTTT AAATGTCAAG AAAGGTCCTG GTGTGAGCTG 2100
TGATGTGTGT GAGCTGTGAT GTGAAGGTTT ACACGCCAGG CAGCGTGTTC CTCCAGGTAG 2160
ACCGTCTAAT CAATCTTTGC AGCAGCCCTC AGGTGACTGT TATTAGAAT CAGGTTGTTT 2220
TTGGTTTTCC AGACAGGGTT TCTCTGTGTA GCCCTGGCTG ACCTAGAACT TACGCTGTAG 2280
ACCAGGCTGG CTTGAACTC ACACAGCTCC TCTGAGTGCT GGTGCAGGAG TTAACGTCGT 2340
GGACCGGTAT CATCACTTTT CTGCGGTGA CTTCTCCAAA CTGAAACTGC TAAGGCAGTT 2400

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

TTGGCTAAGT CTGTTTATG ACTGCAAATG ACAGCATTCC TGCCTTTGTA TTTCAGGGGA 2460
AATACGATAC ATTATATCGG CCATGTTCCC CAQCACGTGT TTTCTTATAT TGACTTTTAA 2520
CAAATGAATA GGATTATTTT TGGCTTTACA TTTTTCCTA AACTTAAGA TCATATAAAA 2580
TTAACAAATA TGTGAAATTT AAGAATTGTA AATATATATT TACGTTTGAA AGATGATTTT 2640
AAATCCAGGG TTAAAGTGCT TTTTATCTTG TATAGTTTAC ATGCTTTTTT TTTTTTTTGA 2700
TAACCCACTA GACCTTTCEA TTGTATCAGA GTATCCAATT ACATTTACAA TTA TGACTTG 2760
AATTGTATTT CACAGGAATG CTCAAGTTTT GTACATATTT TATAAGGTAT TAAACCTGAT 2820
GTTCTCTTTC TAAAAAAA 2839

配列番号: 7

配列の長さ: 33

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の記述

TATGAGACAG ACTACACAAC TGGCGGCGAG TCC

配列番号: 8

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の記述

ATCATAGTCT CCAACCATCT TCTTGATGTG

WQ 97/32982

PCT/JP97/00665

画面の簡単な説明

図1は生物の形態を示す図面の代用写真である。写真Aはヒトオクルディンに対するラットモノクローナル抗体による培養ヒト腸上皮細胞株T84の免疫蛍光染色写真。写真BはTJ裏打ちタンパク質ZO-1に対するマウスモノクローナル抗体による培養ヒト腸上皮細胞株T84の免疫蛍光染色写真。T84細胞の同一部位を撮影した。

A. 100x 100x

写真Aは、ヒト腸上皮細胞株T84の免疫蛍光染色写真である。

写真Bは、TJ裏打ちタンパク質ZO-1の免疫蛍光染色写真である。

写真Aと写真Bは、同一部位を撮影したものである。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

写真Aと写真Bの比較図である。

WO/97/32982

PCT/JP97/00665

請求の範囲

1. 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するヒトオクルディンタンパク質をコードするDNA。
2. 配列番号4に記載のDNAである、請求項1に記載のヒトオクルディンタンパク質をコードするDNA。
3. 配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち1若しくは複数のアミノ酸が、付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA。
4. 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するイヌオクルディンタンパク質をコードする、配列番号5に記載のDNA。
5. 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するマウスオクルディンタンパク質をコードする、配列番号6に記載のDNA。
6. 請求項1ないし5に記載のDNAを含有するベクター。
7. 請求項6に記載のベクターを保持する形質転換体。
8. 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するヒトオクルディンタンパク質。
9. 配列番号1に記載のアミノ酸配列の1若しくは複数のアミノ酸が、付加、欠失若しくは置換されたアミノ酸配列を有するタンパク質。
10. 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するヒトオクルディンタンパク質の部分ペプチド。
11. 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するイヌオクルディンタンパク質。
12. 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するマウスオクルディンタンパク質。
13. 請求項7に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収することを含む、請求項8ないし11に記載のタンパク質の製造方法。
14. 配列番号4, 5または6に記載の塩基配列の全部または一部を含むものからなるDNAプローブ。
15. 配列番号4, 5または6に記載の塩基配列の一部を含むものからなるDNAプライマー。

WO 97/32982

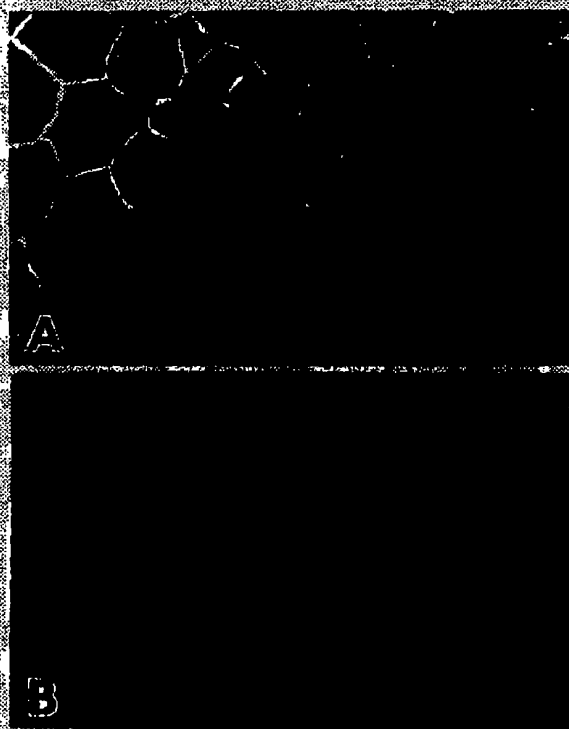
PCT/JP97/00665

16. 請求項8, 11または12に記載のタンパク質と特異的に結合するポリクロナール抗体またはモノクロナール抗体。
17. 請求項15に記載のDNAプライマーを用いることを特徴とする生体試料中の請求項2, 4または5に記載のDNA遺伝子の解析方法。
18. 請求項14に記載のDNAプローブを用いることを特徴とする生体試料中の請求項2, 4または5に記載のDNA遺伝子の解析方法。
19. オクルディンを発現している細胞と被検物質を共存させた後、該細胞のオクルジン遺伝子の発現量を、請求項17又は18の方法により解析することを特徴とする、オクルジンの発現に影響を与える薬物のスクリーニング方法
20. 請求項4に記載のヒトオクルジンDNAに選択的にハイブリダイズする少なくとも6ヌクレオチドを含む医療用ポリヌクレオチド。
21. 請求項16に記載の抗体を含むことを特徴とする、生体試料中のオクルジン測定試薬。

WO 97/32982

PCT/JP97/00665

1



1 / 1

差替え用紙(規則26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00665

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl⁶ C12N15/12, C12N15/63, C07K14/435, C12N1/21, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18, C12P21/08, A61K38/17, G01N33/53 // (C12N1/21, C12R1:19), (C12P21/02, C12R1:19), According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12N15/63, C07K14/435, C12N1/21, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18, C12P21/08, A61K38/17, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIL
BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X //	Cell 80 (Jan. 1995) Natalie Roy et al. "The Gene for Neural Apoptosis Inhibitory Protein Is Partially Deleted in Individuals with Spinal Muscular Atrophy" p. 167-178	3, 6, 7, 9, 13-15 //
A		1, 2, 4, 5, 8, 10-12, 16-21
P, X	J. Cell Biol. 133(1) (Apr. 1996) Yuhko Ando-Akatsuka et al. "Interspecies Diversity of the Occludin Sequence: cDNA Cloning of Human, Mouse, Dog, and Rat-Kangaroo Homologues" p. 43-47	1 - 21
A	J. Cell. Biol. 123(6) (1993) Mikio Furuse et al. "Occludin: A Novel Integral Membrane Protein Localizing at Tight Junctions: p. 1777-1788	1 - 21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 3, 1997 (03. 06. 97)

Date of mailing of the international search report

June 10, 1997 (10. 06. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00665

A. (Continuation) CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(C21P21/08, C12N1:91)

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 97/00665

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ' C12N15/12, C12N15/63, C07K14/435, C12N1/21, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18, C12P21/08, A61K38/17, G01N33/53 // (C12N1/21, C12R1:19), (C12P21/02, C12R1:19), (C12P21/08, C12N1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ' C12N15/12, C12N15/63, C07K14/435, C12N1/21, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18, C12P21/08, A61K38/17, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIL
BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X //	Cell 80 (Jan. 1995) Natalie Roy et al 'The Gene for Neural Apoptosis Inhibitory Protein Is Partially Deleted in Individuals with Spinal Muscular Atrophy' p.167-178	3,6,7,9,13-15 //
A		1,2,4,5,8,10-12, 16-21
P, X	J. Cell Biol. 133 [1] (Apr. 1996) Yuhko Ando-Akatsuka et al 'Interspecies Diversity of the Occludin Sequence: cDNA Cloning of Human, Mouse, Dog, and Rattus Kangaroo Homologues' p.43-47	1-21
A	J. Cell Biol. 123 [6] (1993) Mikio Furuse et al 'Occludin: A Novel Integral Membrane Protein Localizing at Tight Junctions' p.1777-1788	1-21

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.06.97

国際調査報告の発送日 10 June 1997(10.06.97)

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明照

印

4 B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

様式 PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)